T167299

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG4580033

ชื่อโครงการ : การแยกหายีน Glutathione S-transferase (GSTs) ใหม่และการศึกษาคุณลักษณะจากยุงพาหะนำโรคมาลาเรีย *Anopheles dirus* ในไทย

ชื่อนักวิจัย : ดร. แสงทอง พงษ์เจริญกิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

E-mail address: saengton@mju.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี 1 กรกฎาคม 2545- 31 พฤษภาคม 2548

เอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส (Glutathione S-transferases; GSTs) เป็นกลุ่มเอนไซม์พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีบทบาทในการต้านทานสารพิษ เอนไซม์ GSTs ของแมลงเกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อ DDT และสารฆ่าแมลงกลุ่ม pyrethroid ที่ใช้ในโปรแกรมการควบคุมยุงพาหะมาลาเรีย โดยในยุงพาหะมาลาเรียของอาฟริกา (*Anopheles gambiae*; *An. gambiae*) พบว่าเอนไซม์ GSTe2 สามารถสลาย DDT ได้มากขึ้นในสายพันธุ์ต้านทาน ซึ่งความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงในยุงก้นปล่องพาหะมาลาเรียของไทย (*Anopheles dirus*; *An. dirus*) อาจเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ GSTs ดังนั้นเพื่อศึกษาความเกี่ยวข้องนี้จึงต้องแยกยีน *gst* ใหม่ก่อน

ในการวิจัยใช้เทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) แยกบริเวณรหัสยีน *gst* จากยุง *An. dirus* ได้ 3 ยีน ได้แก่ *Anopheles dirus* glutathione S-transferase epsilon class sequence 1 *(adgste1)*, *Anopheles dirus* glutathione S-transferase omega class sequence 1 *(adgsto1)* และ *Anopheles dirus* glutathione S-transferase theta class sequence 1 *(adgstt1)* ยีนทั้ง 3 มีความเหมือนกับยีนกลุ่มเดียวกันในยุง *An. gambiae* 70-90 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกบริสุทธิ์ adGSTE1 ด้วย GSH column เมื่อทดสอบคุณลักษณะทางเอนไซม์ของทั้ง 2 โคลน คือ adGSTE1 WT และ adGSTE1 R139H พบว่าให้ค่า Kinetic parameter แตกต่างกัน ส่วน adGSTT1 นั้นได้ทั้งหมด 4 โคลน แต่แยกบริสุทธิ์ด้วย cationic และ hydrophobic column ได้เพียง 1 โคลน เมื่อทดสอบคุณลักษณะทางเอนไซม์พบว่ามีค่า V_{max} ต่ำที่สุดในเอนไซม์ GSTs ที่ได้จากยุง *An. dirus* ในขณะที่ adGSTO1 ชักนำให้แสดงออกได้มากที่สุด แต่ไม่สามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยการเชื่อมระหว่าง CDNB และ GSH ได้ จึงไม่สามารถแยกบริสุทธิ์เพื่อศึกษาคุณลักษณะทางเอนไซม์ เนื่องจากยังไม่มีการรายงานคุณลักษณะทางเอนไซม์ GST กลุ่ม Theta และ Omega มาก่อนจึงน่าสนใจที่จะศึกษาการทำงานของยีนที่สำคัญที่อนุรักษ์ไว้ในยุงพาหะมาลาเรียทั้ง 2 ชนิด

จากการใช้ Genomic DNA เป็นแม่พิมพ์ในการทำ PCR เมื่ออ่านลำดับเบสของผลผลิตที่ได้จากไพร์เมอร์ *adgste1* และ *adgstt1* พบว่าบริเวณรหัสของยีนทั้งสองประกอบด้วย 2 เอกซอน และ 1 อินทรอน โดยขนาดของเอกซอนและอินทรอนของยีนทั้งสองอนุรักษ์ในยุง *An. dirus* และยุง *An. gambiae* จึงเป็นไปได้ว่ายีนทั้งสองต้องมีหน้าที่สำคัญที่ต้องอนุรักษ์ในวิวัฒนาการ

คำหลัก : เอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส, ยุงก้นปล่อง, การแยกยีน, บริเวณรหัส, โครงสร้างของยีน

TE167299

Abstract

Project code: TRG4580033

Project Title: Isolation and characterization of novel glutathione S-transferase genes from Thai malaria vector, *Anopheles dirus*.

Investigator: Dr. Saengtong Pongjaroenkit, Department of Biology, Faculty of Science, Maejo University

E-mail address: saengton@mju.ac.th

Project Period: 3 years 1 July 2002 – 31 May 2005

Glutathione S-transferases (GSTs) are a superfamily of multifunctional enzymes, which are found in most organisms. The GSTs play an important role in the metabolism of toxins such as insecticides by conjugation of toxins to glutathione (GSH; γ-glutamyl-cysteinyl-glycine). Insect GSTs are involved in resistance to DDT and pyrethroid, which is currently used in malaria vector control program. The GSTe2 of *Anopheles gambiae* (*An. gambiae*) has the highest DDTase activity currently observed as well as increased expression in resistant mosquitoes. Thus the resistance of *Anopheles dirus* (*An. dirus*) may be implicated with GSTs. To study the role of GSTs in insecticide resistance, *gst* genes have to be isolated.

Coding region of 3 *gst* genes were isolated by RT-PCR which named as *Anopheles dirus* glutathione S-transferase epsilon class sequence 1 (*adgste1*), *Anopheles dirus* glutathione S-transferase omega class sequence 1 (*adgsto1*) and *Anopheles dirus* glutathione S-transferase theta class sequence 1 (*adgstt1*). They showed 70-90% identity to the orthologous *An. gambiae gst* genes. Two clones of adGSTE1 (adGSTE1 WT and adGSTE1 R139H) were purified by GSH affinity chromatography and characterized. The single amino acid change affected the enzyme activity. Four clones of adGSTT1 were obtained but only one clone was purified by cationic and hydrophobic column. The purified adGSTT1 showed the lowest V_{max} among *An. dirus* GSTs characterized to date. Whereas adGSTO1 showed very low activity toward classical GSTs substrates such as 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB). Therefore the study of adGSTO1 enzyme activity could not be performed. Currently, there is no enzymatic information for theta and omega insect GSTs. Thus, the characterization of these GSTs should be further studied.

The PCR of genomic DNA of *adgste1* and *adgstt1* revealed that the coding region of these *gst* genes is composed of 2 exons and 1 intron. The conservation of exon and intron size in *An. dirus* and *An. gambiae* suggests that these two genes should have an important role.

Keywords: *Anopheles dirus*, Glutathione S-transferase, Gene isolation, Coding region, Gene structure